

REC'D 29 OCT 1997

WIPO PCT



Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Immunogene Peptide von Maul- und Klauenseu-
chen-Viren"

am 18. September 1996 beim Deutschen Patentamt einge-
reicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K, C 07 H und A 61 K der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 18. Juni 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

W. Wehner

Wehner

Aktenzeichen: 196 38 044.8

Immunogene Peptide von Maul- und Klauenseuchen-Viren

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft immunogene Peptide mit mindestens 8 Aminosäuren, die in Nichtstrukturbereichen des Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSV oder foot and mouth disease virus = FMDV) vorkommen.

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine akute Infektionskrankheit, die bei den wichtigsten Milch- und Fleischlieferanten - Rinder, Schweine, Ziegen und Schafe - auftritt.

- 10 Der Krankheitsverursacher ist ein Picornavirus, das Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV). Es handelt sich dabei um ein RNA-Virus mit einer 8,5 kb langen einzelsträngigen RNA mit Plusstrangpolarität, das in verschiedenen Serotypen mit zahlreichen Subtypen auftreten kann. Tiere, die sich von einer Infektion mit einem Serotyp erholt haben, bleiben für eine Infektion mit einem anderen Serotyp voll
15 empfänglich.

- Die primäre Replikation des Virus, nach einer Infektion über die Atemwege, findet im Pharynx statt. Danach werden benachbarte Lymphknoten infiziert und das MKSV tritt ins Blut über. Über das Blut breitet sich das Virus in die verschiedenen Organe und Gewebe aus. Klinische Symptome treten 2-14 Tage nach der
20 Infektion auf, abhängig von Virusdosis, -stamm und Weg der Infektion. In weniger schwierigen Fällen ist die Infektion nach 14 Tagen überwunden. Eine MKSV-Infektion verläuft bei älteren Tieren nur selten tödlich, hat aber einen erheblichen Einfluß auf deren Produktivität, Wachstum und Wohlbefinden. Außerdem können die gesunden Tiere das MKSV trotz hoher Antikörper-Titer ausscheiden und
25 somit andere Tiere infizieren. Problematisch sind ebenfalls vakzinierte Tiere, die infektiösem Virus ausgesetzt waren. Diese Tiere können ebenfalls persistent infiziert bleiben, ohne klinische Symptome zu zeigen. Diese Tiere, die zwar gesund sind, aber trotzdem MKSV tragen, werden als "Carrier" bezeichnet und stellen eine ernste Gefahr bei der Weiterverbreitung des MKSV dar. Eine Virusisolation
30 aus Schweinen ist bis zu einem Monat nach der Infektion (Van Bakkum; 1973), bei Rindern sogar über mehrere Jahre hinweg möglich (Hedger, 1970)

Die Hülle der Viruspartikel besteht aus je 60 Kopien der 4 Strukturproteine 1A-1D (Rueckert, 1990), die die einzelsträngige RNA einschließen. Das Kapsid ist nicht

behüllt und hat eine icosaedrische Form. Die Proteine 1B-1D liegen zum Teil an der Oberfläche, während das Protein 1A (P1A) im Inneren des Kapsids liegt.

Die im N-terminalen Teil des Genoms kodierten Proteine 1A-1D sind Strukturproteine und bilden das eikosaedrische Kapsid. Die Nichtstrukturproteine 2A-2C und 3A sind C-terminal kodiert und für die Virusreplikation verantwortlich.

Die Bekämpfung der MKS wird durch die einfache Übertragbarkeit des Virus, seine Fähigkeit viele Tierarten zu infizieren und seine multiplen antigenen Formen erschwert.

Die Vakzinierung gegen MKS erfolgte in Deutschland bis 1992 mit einer trivalenten Totvakzine für die Subtypen O, A und C. Diese aus inaktivierten Viren bestehende Vakzinen sind jedoch thermisch instabil und garantieren keine lang anhaltende Immunität (Terpstra et al., 1989). Die Gefahr, die von den Impfstoffen ausgeht, besteht vor allem in der Anwesenheit von nicht inaktivierten Viren in der Totvakzine und der Freisetzung von Viren aus den jeweiligen Vakzineproduktionsstätten (Beck et al., 1987).

In der Europäischen Union (EU) gelten Handelsbeschränkungen für Tiere, in denen Antikörper gegen das MKSV nachgewiesen werden können. Dies gilt sowohl für Tiere, die eventuell eine Infektion überstanden haben, als auch für mit einer konventionellen Totvakzine immunisierte Tiere.

Aus diesem Grund wird seitdem verstärkt versucht, bessere Impfstoffe gegen das MKSV zu entwickeln. Es wäre wünschenswert, Impfstoffe in die Hand zu bekommen, die sich durch eine längere Haltbarkeit, eine bessere Wirkung und größere Sicherheit auszeichnen. Von Vorteil wäre zudem eine Vakzine, die es ermöglichen würde, vakzinisierte von infizierten Tieren zu unterscheiden.

Drei Dinge müssen bei der Entwicklung von Vakzinen mit spezifischen Epitopen besonders beachtet werden:

1. Der Polymorphismus von Proteinen des Pathogens tritt vor allem in den an der Immunantwort beteiligten Proteinabschnitten auf. Besonders RNA-Viren („Quasispezies“) enthalten Regionen mit extrem hoher Sequenzvariabilität.

2. Speziell bei der T-Zell-Immunantwort besteht eine hohe Variabilität einzelner Individuen der Wirtsart. Eine T-Helfer-Zelle erkennt in der Regel ein bestimmtes antigenes Peptid nur in Zusammenhang mit einem bestimmten MHC-II-Molekül (Schwartz, 1985). Jedes Individuum exprimiert einen eigenen Satz MHC-Moleküle, die von Genen mit hoher alleler Variation (MHC-Polymorphismus) kodiert werden. Daher kann eine T-Zell-Antwort gegenüber Peptiden individuell verschieden sein.
3. Die T-Zell-Fraktionen zeigen sehr heterogene Effektormechanismen, die allerdings in der Regel mit der MHC-Restriktion korrelieren. (Mosmann et al., 1989). Für das MKSV beim Rind konnten bislang nur MHC-II-restringierte T-Helferfunktionen nachgewiesen werden (Glass et al., 1989; Glass et al., 1990; Glass et al., 1992; Collen et al., 1991).

Zur Herstellung von Peptidvakzinen müssen zuerst die immunogenen Bereiche des Pathogens bekannt sein, das heißt die Stellen eines Pathogens, die vom Immunsystem der natürlichen Wirtsspezies, also von den B- oder den T-Lymphozyten von Rind und Schwein erkannt werden. Hierüber liegen bislang keine Erkenntnisse vor.

Es wurde nun gefunden, daß man MKSV-Vakzinen herstellen kann auf der Basis von Peptiden mit einer Sequenz von mindestens 8 Aminosäuren, die einer Teilsequenz aus dem Nichtstrukturproteinbereich des MKSV entspricht, die durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen Antikörpern oder durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen T-Lymphozyten selektiert wurde.

Solche Peptide bestehen bevorzugt aus 8-35 Aminosäuren, besonders bevorzugt aus 8-25 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt aus 8-15 Aminosäuren.

Zur Herstellung einer MKSV Vakzine für Schweine müssen solche Peptide Teilen von Bereichen auf dem Genom des MKSV entsprechen, die für die Proteine L/L', 1A, 1B, 1C, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D kodieren.

Zur Herstellung einer MKSV Vakzine für Rinder müssen solche PeptideTeilen von Bereichen auf dem Genom des MKSV entsprechen, die für die Proteine 1D, 2B, 2C, 3A, 3B kodieren.

Besonders bevorzugt sind daher Peptide, die Teilen von Bereichen auf dem Genom des MKSV entsprechen, die für die Proteine 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D kodieren.

Im einzelnen seien hier die im Sequenzprotokoll genannten Peptide erwähnt.

- 5 Besonders hervorgehoben seien die im Sequenzprotokoll genannten Peptide mit den ID-Nummern: 6, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45.

Besonders hervorgehoben seien außerdem die Peptide mit den ID-Nummern 12, 13, 14, 22, 33, 37, 40, 41, 42, 45, 46, 47.

- 10 Ganz besonders hervorgehoben seien die Peptide mit den ID-Nummern: 37, 40, 42, 45, 47.

- 15 Wie bereits erwähnt, entsprechen die erfindungsgemäßen Peptide in Teilbereichen der Nichtstrukturproteine des MKSV. Diese Bereiche werden durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen Antikörpern oder durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen T-Lymphozyten bestimmt.

Produkte, die diese Sequenzen beinhalten können sowohl für Immunisierungen zum Schutz gegen das Virus der Maul- und Klauenseuche, wie auch zum Nachweis einer MKSV Infektion, d.h. zu diagnostischen Zwecken verwendet werden.

- 20 Unter Immunreaktivität in diesem Zusammenhang versteht man die Reaktivität mit MKSV-spezifischen Antikörpern. Der Nachweis einer Reaktion erfolgt in diesem Fall über eine Interaktion der MKSV-spezifischen Antikörper mit den an eine Festphase gebundenen Peptiden über einen Enzymimmunoassay der eine Farbreaktion beinhaltet. Eine weitere Möglichkeit die Reaktivität nachzuweisen besteht im Nachweis der Kompetition der Bindung der MKSV-spezifischen
25 Antikörper an rekombinante virale Proteine durch die betreffenden Peptide.

Unter Immunreaktivität versteht man auch die Reaktivität der Peptide mit Lymphozyten, die von MKSV-infizierten/vakzinierten Tieren gewonnen wurden. Diese Lymphozyten sind in der Lage nach Koinkubation mit den betreffenden Peptiden spezifische Reaktionen zu zeigen: a) vermehrtes peptidkonzentrations-

abhängiges Wachstum (eine peptidantigenspezifische Proliferation); b) eine peptidspezifische vermehrte Produktion von spezifischen Substanzen (Zytokine, z.B. Interleukin-2); c) sowie die Differenzierung zu virusspezifischen zytolytischen T-Lymphozyten, die in der Lage sind, die betreffenden Peptide in Assoziation mit Molekülen, die vom Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) kodiert werden, zu erkennen und Zellen, die die betreffenden Peptide an der Oberfläche tragen zu lysieren.

MKS-spezifische Antikörper sind Antikörper, die nach einer Vakzination oder nach einer Infektion mit dem MKSV im Tier gebildet werden und in der Lage sind gewisse Strukturen des MKSV zu erkennen und an diese Strukturen zu binden. Sie können ex vivo, in vitro mit Hilfe eines virusspezifischen Enzym-immunoassays nachgewiesen werden. Die MKSV-spezifischen Antikörper erkennen dabei entweder das gesamte Virus, bestimmte virale Proteine oder Proteinfragmente in Form von Peptiden, die durch virusspezifische Sequenzen kodiert werden.

MKS spezifische T-Lymphozyten können erhalten werden, indem man mononukleäre Zellen aus dem Blut MKSV-infizierter oder vakzinierter Tiere isoliert.

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) von Schweinen wird heparinisiertes Blut (0,1 mg Heparin pro ml Blut) im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Davon werden bei Raumtemperatur je 30 ml auf 15 ml Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml in 50 ml Röhrchen geschichtet. Nach einer Zentrifugation von 25 min bei 1100 g können die mononukleären Leukozyten aus der Interphase zwischen Serum und Ficoll vorsichtig abpipettiert werden. Die so isolierten Zellen werden einmal mit PBS und zweimal mit jeweils 20 ml Lymphozytenkulturmedium/10% FCS in 50 ml Röhrchen gewaschen und pelletiert (jeweils 10 min, 750 g).

Anreicherung von T-Lymphozyten durch Nylonwatte-Säulen

Dieses Anreicherungsverfahren von T-Lymphozyten beruht auf der physikalischen Adhärenz von B-Lymphozyten und einem Teil der Monozyten an Nylonwatte. Zu diesem Zweck wird die Nylonwatte dreimal in destilliertem Wasser aufgekocht, bis zur 5 ml Marke in 10 ml Spritzen locker gestopft und autoklaviert (120°C, 20 min). Vor Gebrauch werden die Säulen zweimal mit 20 ml PBS gespült. Zur Regulation der Auslaufgeschwindigkeit wird eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,8 mm aufgesetzt. Beim anschließenden Spülen mit 10 ml Lymphozytenkulturmedium wird die Spülflüssigkeit bis zum Anfang der Säule abgelassen und die Kanüle dann mit einem Gummistopfen abgedichtet. Auf jede Säule werden bis zu 1×10^8 PBMC in 1 ml Medium gegeben, dazu wird der Gummistopfen kurz abgezogen um die zellhaltige Flüssigkeit einlaufen zu lassen. Dann wird ein Spritzenstopfen vorsichtig aufgesetzt, um das Austrocknen der Säule zu verhindern und eine Kontamination bei der folgenden Inkubation für 45 min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) zu vermeiden. Die T-Lymphozyten oder NW-PBMC (nylonwool-purified PBMC) können durch Spülen der Säule mit 20 ml Lymphozytenkulturmedium bei aufgesetzter Kanüle eluiert werden.

Die Bestimmung der Immunreaktivität erfolgt in an sich bekannter Weise nach Methoden, die in

20 SAALMÜLLER, A., JONJIC, S., BÜHRING, H.-J., REDDEHASE, M. J. & KOSZINOWSKI, U.H. (1987). Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. II. Detection of an antigen on resting T cells down-regulated after activation. *J. Immunol.* 138, 1852-1857.

25 SAALMÜLLER, A. & MAURER, S. (1994). Major histocompatibility antigen class II expressing porcine T lymphocytes are potent antigen-presenting cells in mixed leucocyte culture. *Immunobiol.*, 190, 23-34

SAALMÜLLER, A., HIRT, W., MAURER, S. & WEILAND, E. (1994). Discrimination between two subsets of porcine CD8⁺ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology*, 81, 578-583.

30 PAULY, T., ELBERS, K., KÖNIG, M., LENGSELD, T., SAALMÜLLER, A. & THIEL, H.-J. (1995). Classical Swine Fever Virus-specific cytolytic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J. Gen. Virol.*, 76, 3039-3049.

SUMMERFIELD A., RZIHA, H.-J. & SAALMÜLLER, A. (1996). Functional characterization of porcine CD4⁺CD8⁺ extrathymic T lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 168, 291-296.

- 5 PAULY, T, WEILAND, E., HIRT, W., DREYER-BUX, C., MAURER, S., SUMMERFIELD, A. & SAALMÜLLER, A. (1996). Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology*, 88, 238-246.

beschrieben sind.

- 10 Beispielsweise wird dazu folgende Messung der virusantigenspezifischen Proliferation (Proliferationsassay) beschrieben:

- 15 PBMC oder daraus isolierte Zellpopulationen wurden in Rundbodenmikrotiterplatten bei einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro Mikrokultur (200 µl/Vertiefung) in einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml in MEM alpha-Medium ausgesät. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von Virus bzw. Peptiden aus den kodierenden Bereichen des Maul- und Klauenseuche Virus (MKSUV) (spezifische Aktivierung). Die Angabe der zugegebenen Virusmenge erfolgte in MOI (multiplicity of infection), die der Anzahl an infektiösen Partikeln entspricht. Die Zellen wurden dann im Brutschrank kultiviert. Nach 5 Tagen wurden 37 kBq (1 µCi) ³H-Thymidin/Vertiefung, das in 20 µl Medium aufgenommen wurde, zugegeben und
- 20 die Kultur für weitere 18 h inkubiert. Anschließend wurde durch Einfrieren der gesamten Mikrotiterplatte der ³H-Thymidineinbau gestoppt und die Zellen lysiert. Mit Hilfe des Zellerntegerätes (Cell Harvester) wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf Filtermatten gesaugt. Diese wurden im Mikrowellenherd (160 W, ca. 5 min) getrocknet. Danach wurde eine Feststoffsintillatorplatte im Mikrowellenherd
- 25 (160 W, ca. 2 min) auf die Filtermatte aufgeschmolzen. Nach Abkühlen des Sintillators wurde die Filtermatte in einen durchsichtigen Probenbeutel eingeschweißt und die Radioaktivität der Einzelkulturen in Zerfällen pro Minute (counts per minute, cpm) im Szintillationszähler gemessen.

Bestimmung des IL-2-Gehaltes aus dem Zellkulturüberstand virusantigenspezifisch aktivierter T-Lymphozyten (IL-2-assay)

5 Zu einer semiquantitativen Bestimmung des Interleukin-2 (IL-2) -Gehaltes porciner Leukozytenkulturen wird die murine, IL-2 abhängige HT-2-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie wächst nur in Anwesenheit von IL-2, das sowohl murinen, humanen als auch porcinen Ursprungs sein kann. Die Proliferation der HT-2-Zelllinie ist somit ein Maß für den IL-2-Gehalt im Zellkulturüberstand, der wiederum mit der IL-2 Produktion der jeweiligen Zellpopulation korreliert.

10 Nach Aktivierung von PBMC oder daraus isolierter Zellpopulationen werden nach 5 Tagen 100 µl zellfreier Überstand aus den jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte abgenommen. Drei Parallelproben wurden vereinigt und in Rundbodenmikrotiterplatten in log₂-Stufen titriert (Überstand 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 in Medium; jeweils 100 µl/Mikrokultur). Schließlich werden 100 µl einer Zellsuspension mit 4×10^3 HT-2 Zellen pro Vertiefung zugefügt, so daß das Endvolumen 200 µl/Vertiefung beträgt. Zur Messung der Proliferation der HT-2 Zellen werden jeweils triplicate Kulturen angelegt. Als Referenzsubstanz wird humanes, rekombinantes IL-2 mit bekannter Zahl internationaler Einheiten (international units, IU) mitgeführt und über mehrere Stufen titriert. Das Wachstum der HT-2 Zellen wird durch Bestimmung der DNA-Synthese quantifiziert. Dazu wird nach 20 24 h Inkubation ³H-Thymidin (37 kBq/Mikrokultur) zugegeben und danach die Zellen für weitere 18 h im Brutschrank inkubiert. Das weitere Verfahren entspricht dem der Messung der Lymphozytenproliferation.

Messung der zytolytischen Aktivität von virusantigenspezifischen zytolytischen T-Lymphozyten

25 Virusantigenspezifische zytolytische T-Lymphozyten entstehen durch eine mindestens einwöchige Kokultivierung von PBMC eines infizierten Tieres oder daraus isolierten Zellpopulationen (2×10^5 Zellen / Vertiefung) mit autologen MKSV-infizierten (1-10 MOI) Nierenepithelzellen. Die virusantigenspezifische Aktivität der dabei generierten zytolytischen T-Lymphozyten (CTL) wird über 30 ⁵¹Chrom-Freisetzungstests bestimmt. In diesen Tests werden die CTL für 4 bis 8 Stunden entweder mit autologen ⁵¹Chrom-markierten MKSV-infizierten Nierenepithelzellen oder peptidbeladenen Nierenepithelzellen kokultiviert und danach das durch die CTL-Aktivität freigesetzte Chrom im Überstand der jeweiligen Zell-

kulturen bestimmt. Als Kontrollen für diesen Versuch werden nicht-infizierte Nierenepithelzellen mitgeführt. Die spezifische Aktivität der CTL errechnet sich über folgende Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = x - \text{Spontanlyse} / \text{Gesamteinbau} - \text{Spontanlyse}.$$

- 5 Zur weiteren Analyse von CTL-Epitopen werden auch rekombinante Vakzinia-MKS-Viren eingesetzt, wobei die Vakziniaviren Teilsequenzen des MKSV tragen und bei einer Infektion exprimieren.

10 Die Herstellung der Peptide erfolgt in an sich bekannter Weise. Zum Beispiel wurde die multiple Peptidsynthese auf einem modifizierten Tecan Roboter durchgeführt.

Dabei wurden jeweils 30 des ADPV-Harzes (Beladung 0,4 mmol/g) zur Darstellung der Hexapeptide in die Reaktionsgefäße eingewogen. Zur Mikrosynthese der anderen Peptide kamen je 5 mg des Rink-Amid MBHA-Harzes (0,47 mmol/g) zum Einsatz.

- 15 Dann konnten die Sequenzen der darzustellenden Peptide dem Steuerungsrechner des Synthesizers eingegeben und die benötigten Fmoc-Aminosäuren in die Vorratsgefäße eingewogen werden. Die Aminosäuren wurden in 0,5 M HOBt in DMF zu einer Konzentration von 0,5 M gelöst. Schwerlösliche Aminosäuren wurden 5-10 min im Ultraschallbad behandelt, bis eine klare Lösung vorlag. Die zur
- 20 Aktivierung benötigte 2M DIC-Lösung wurde mit DCM/DMF (8:2) hergestellt. Piperidin, zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, wird auf 40% in DMF verdünnt und mit der DIC-Lösung im Synthesizer bereitgestellt. Der Aufbau der Peptide erfolgte durch Einfachkupplung und wurde nach dem folgenden Syntheseprotokoll durchgeführt:

- 25
1. Fmoc-Abspaltung durch 100 µl 40% Piperidin für 15 min.
 2. Sechs Waschzyklen mit je 150 µl DMF und 0,3 min.
 3. Zugabe von 30 ml des Kupplungsreagenz (2M DIC in DMF) in die Reaktionsgefäße.
 4. Zugabe von 60 µl der aktivierten Fmoc-Aminosäure (Fmoc-AS gelöst in 0,5 M HOBt/DMF).
- 30
5. Stehenlassen dieser Lösung für 60 min zur Kupplung der Aminosäure.
 6. Drei Waschzyklen mit je 150 µl DMF, 0,6 min.

Nach Ende der Synthese wurden die Harze zweimal mit Ether (200 µl) gewaschen und getrocknet.

5 Zur Abspaltung der in der Mikrosynthese dargestellten Peptide wurde modifiziertes Reagenz K (0,75 g kristallines Phenol, 0,25 ml Ethandithiol, 0,5 ml Thioanisol) eingesetzt. Alle anderen Peptide sind mit Thioanisol/Thiokresol (1:1) in TFA abgespalten worden. Dabei wurden die Synthesespitzen aus dem Syntheseblock entfernt und die Auslauföffnungen mit flüssigem Wachs verschlossen. Konzentrierte TFA löst dabei langsam das Wachs an der Auslauföffnung auf und die Abspaltung, mit dem bereits vom Harz abgespaltenen Peptid kann nun in die unter den
10 Synthesespitzen angebrachten PP-Röhrchen tropfen. In den PP-Röhrchen können weiterhin die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten werden. Es wurden dabei 150 µl Scavenger/TFA-Lösung je Spitze zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. In die PP-Röhrchen wurde danach mit einer 8-Kanal-Spritze ungefähr 1 ml Ether/Heptan (1:1) gegeben und für 2 h auf -20°C gestellt. Der gebildete
15 Niederschlag wurde abzentrifugiert (2000 U/min, 5min), der Ether abdekantiert und das Pellet zweimal mit Diethylether (1-2ml) mit Ultraschall resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurde der Niederschlag in 1-1,5ml tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

Isolierung von Seren und Bestimmung des Gehaltes spezifischer Antikörper

20 Gewinnung von Rinder- und Schweineseren

Unverdünntes Blut wurde so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis es geronnen war und sich das Fibrin zusammen mit den Blutzellen abgesetzt hatte. Das im Überstand befindliche Serum wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Standard-Peptid-ELISA

25 Der Standard-Peptid-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern in Seren infizierter oder vakzinierter Tiere wurde wie folgt durchgeführt.

30 Die ELISA-Platten (Nunc-Immuno Plate Maxisorb) wurden mit Peptiden in Konzentrationen von 0,5, 1 und 3 µg pro Vertiefung beschichtet. Die Peptide wurden zunächst in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Daraus wurde dann die Stammlösung von 1 mg/ml in destilliertem Wasser angesetzt. 100 µl der in destilliertem Wasser verdünnten Peptidstammlösung wurden dann über Nacht

bei 37°C eingetrocknet. Daraufhin wurden die Platten für 2 h bei 37°C mit 3% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) in PBS vorinkubiert, um unspezifische Bindungen in den folgenden Inkubationsschritten zu verhindern. Die Platten wurden nach jedem Inkubationsschritt dreimal mit PBS-Tween gewaschen, vor der Zugabe des Substrates fünfmal. Sowohl die eingesetzten Seren als auch Konjugate wurden in 0,5% BSA in PBS verdünnt.

Die Seren infizierter oder vakzinierter Rinder oder Schweine wurden in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Es wurden je 80 µl der Serumverdünnung pro Vertiefung eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde das entsprechende Meerrettichperoxidase-gekoppelte Konjugat dazugegeben entweder Ziege anti-Rind (Verdünnung 1:2.500) oder Ziege anti-Schwein (Verdünnung 1:5.000). Danach wurde nochmals 1 h bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde zum Nachweis positiver Proben 60 µl Substrat/Vertiefung zugegeben. Als Substrat diente in Citratpuffer gelöstes Orthophenylendiamin (OPD). Die Umsetzung des Substrates durch die Meerrettichperoxidase in Form einer Farb-reaktion erfolgte bei Raumtemperatur im Dunklen. Sie wurde nach ca. 20 min mit 2 M Schwefelsäure gestoppt, sofern die Färbung der eingesetzten Positivkontrolle ausreichend war. Die Farbintensität wurde im ELISA-Meßgerät bei 492 nm gemessen.

20 Biotin-Streptavidin-ELISA

Da Schweineseren eine äußerst hohe unspezifische Reaktion zeigen, wurde versucht, die Sensitivität des Meßsystems durch einen modifizierten ELISA zu erhöhen. Dazu wurden biotinylierte Peptide verwendet.

Diese biotinylierten Peptide wurden in den gleichen Konzentration, wie die Peptide im Standard-Peptid-ELISA eingesetzt. Anstatt in destilliertem Wasser wurden sie allerdings mit PBS/0,5% BSA verdünnt. 100 µl/Vertiefung dieser Lösung wurden auf Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten aufgetragen, und 50 µl Serum entsprechend den Konzentrationen des Standard-Peptid-ELISA zugegeben.

Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur, dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und Zugabe von 150 µl Meerrettichperoxidase markierte Ziege anti Rind oder Ziege anti Schwein Antiseren pro Vertiefung (Verdünnung siehe Standard-Peptid-ELISA) wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde dreimal gewaschen und 150 µl Azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-sulfonat- (ABTS) Substratlösung

pro Vertiefung zugegeben. Die Messung der Extinktion (optical density, OD) erfolgte jeweils nach 15 min und 1 h bei 405 nm im ELISA-Meßgerät.

Kompetitions-ELISA

Die bisher durchgeführten ELISA, der Standard-Peptid- und Biotin-Streptavidin-ELISA dienen in der Regel zur Detektion linearer B-Zell-Epitope. Häufig erkennen jedoch die betreffenden Immunglobulinmoleküle keine linearen, sondern Konformationsepitope. Diese Art von Epitopen lassen sich unter Umständen im Kompetitions-ELISA nachweisen. Dazu wurden ELISA-Platten (Nunc-Immuno Plate Maxisorb) zuerst mit 100 µl einer Proteinlösung in geeigneter Konzentration, die gerade noch eine positive Reaktion im Standard-Peptid-ELISA zeigte, über Nacht beschichtet. Die Platten wurden dann entsprechend dem Standard-Peptid-ELISA für 2 h mit PBS/3% BSA vorinkubiert. Vor der Zugabe des Serums (Konzentration 1:1000) wurde dieses für mindestens 1 h mit 100 µg/ml der zu untersuchenden Peptide in einer Mikrotiterplatte vorinkubiert. Danach wurde entsprechend dem Standard-Peptid-ELISA verfahren.

Ergebnisse

Identifizierung linearer B-Zell-Epitope

Zur Identifizierung linearer B-Zell-Epitope des MKSV beim Rind und Schwein wurden 14mer und 15mer Peptiden, die entsprechend des offenen Leserasters des MKSV-Genoms synthetisiert wurden darauf untersucht, ob sie von Antikörpern aus Seren infizierter oder vakzinierter Tiere erkannt werden.

Untersuchung synthetischen MKSV-Peptide auf lineare B-Zell-Epitope beim Schwein

5 Die Peptide mit den ID-Nummern 6, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45 des Sequenzprotokolls wurden als B-Zell Epitope des Schweins identifiziert.

Identifizierung linearer B-Zell-Epitope des MKSV beim Rind

Die Peptide mit den ID-Nummern 12, 13, 14, 22, 33, 37, 40, 41, 42, 45, 46, 47 des Sequenzprotokolls wurden als lineare B-Zell Epitope des MKSV beim Rind identifiziert.

10 **Identifizierung von B-Zell-Konformationsepitopen auf dem 3D-Protein des MKSV**

Bei der Durchführung eines Kompetitions-ELISA mit rekombinantem 3D-Protein wurden 8 Peptide identifiziert, die in der Lage sind, MKSV spezifische Antikörper gegen das 3D-Protein aus dem Serum zu binden. Es handelt sich um die Peptide
15 mit den ID-Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 des Sequenzprotokolls.

Nutzung der linearen B-Zell-Epitope zur Unterscheidung zwischen MKSV infizierten und vakzinierten Tieren

Es wurden in diesem Test Seren von mit verschiedensten Serotypen des MKSV infizierten und vakzinierten Tieren untersucht. Als Kontrollen dienten Seren von
20 nicht-infizierten Tieren und Seren von Tieren, die mit dem bovinen Leukämievirus (BLV) infiziert waren.

Es zeigte sich, daß das Peptid mit der ID-Nummer 37 aus dem 2B-Bereich des MKSV mit vielen Seren von MKSV infizierten oder vakzinierten Tieren positiv reagierte. Mit Seren von BLV infizierten Tieren oder negativen Seren zeigte es in
25 der Regel keine Reaktion.

Weiter kann man erkennen, daß Seren von MKSV-Stamm O₁K infizierten Tieren im Vergleich zu den anderen Testgruppen auf die größte Anzahl von Peptiden reagierten. Es ist auch ein Unterschied zwischen Typ O infizierten und vakzinierten Tieren feststellbar. Im Gegensatz zu vakzinierten Tieren, die vor allem mit dem

Peptid ID-Nummer 37 und dem Kontrollpeptid G1-32 reagierten, zeigten die Seren infizierter Tiere zusätzlich mit den Peptiden ID-Nummern 45, 41, 45, 47 und 12 eine deutliche Reaktivität.

Literaturverzeichnis

- Beck E. and Strohmaier K. (1987) Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. J. Virol. 61: 1621-1629.
- 5 Collen T., DiMarchi R. and Doel T.R. (1991) A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. J. Immunol. 146: 749-755.
- Glass E.J. and Spooner R.L. (1989) Requirement for MHC class II positive accessory cells in an antigen specific bovine T cell response. Res. Vet. Sci. 10 46: 196-201.
- Glass E.J., Oliver R.A. and Spooner R.L. (1990) Variation in T cell responses to ovalbumin in cattle: evidence for Ir gene control. Animal Genetics 21: 15-28.
- 15 Glass E.J., Oliver R.A., Collen T., Doel T.R., DiMarchi R. and Spooner R.L. (1992) MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. Immunology 74: 594-9.
- Hedger R.S. (1970) Observations on the carrier state and related antibody titres during an outbreak of foot-and-mouth disease. Journal of Hygiene 68: 53-60.
- 20 Rueckert R.R. (1990) Picornaviridae and their replication. In: Virology Sec. Ed. 507-548. (Fields B.N. et al.) Raven Press, New York.
- Schwartz R.H. (1985) T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. Annu. Rev. Immunol. 3: 237-61.
- 25 Terpstra C. and van Maanen C. (1989) Protection and virus transmission of dutch cattle following intranasal challenge with homologous and hetero-

logous FMD virus strains 1-3 years after three consecutive annual vaccination. Report of the 11th International Symposium of the word association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases, Perugia-Mantova, Italy, 2-6 October, p. 154. Esculapio, Bologna.

- 5 **van Bakkum J.G. (1973)** The carrier state in foot-and-mouth disease. In: Pollard M., ed. Proceedings of the 11th International Conference on FMD. New York: Gustav Stern Foundation Inc, 1973: 37-44.

1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(A) NAME: BAYER AG
(B) STRASSE: BAYERWERK
(C) ORT: LEVERKUSEN
(E) LAND: GERMANY
(F) POSTLEITZAHL: D- 51368
(G) TELEFON: 0214/ 30 61285
(H) TELEFAX: 0214/ 30 3482

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 47

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Arg Val His Val Met Arg Lys Thr Lys Leu Ala Pro Thr Val
1 5 10 15

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Arg	Lys	Thr	Lys	Leu	Ala	Pro	Thr	Val	Ala	His	Gly	Val	Phe
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Leu	Ala	Pro	Thr	Val	Ala	His	Gly	Val	Phe	Asn	Pro	Glu	Phe	Gly
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Arg Cys Ala Ala Asp Tyr Ala Ser Arg Leu His Ser Val Leu Gly
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Asn Gly Thr Val Gly Pro Glu Val Glu Ala Ala Leu Lys Leu Met
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Glu Lys Arg Glu Tyr Lys Phe Val Cys Gln Thr Phe Leu Lys Asp
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Ala	Gln	Met	His	Ser	Asn	Asn	Gly	Pro	Gln	Ile	Gly	Ser	Ala	Val
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Ile	Gly	Ser	Ala	Val	Gly	Cys	Asn	Pro	Asp	Val	Asp	Trp	Gln	Arg
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Val Trp Asp Val Asp Tyr Ser Ala Phe Asp Ala Asn His Cys Ser
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Glu Asn Lys Arg Ile Thr Val Gly Gly Gly Met Pro Ser Gly Cys
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

His Phe Lys Ser Leu Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ala Asp Lys Ser
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu	Lys	Ala	Arg	Asp	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Ser	Glu	Glu	Lys	Phe	Val	Thr	Met	Thr	Asp	Leu	Val	Pro	Gly	Ile
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- Thr Gly Phe Ile Pro Pro Met Ala Ser Leu Glu Asp Lys Gly Lys
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Glu	Leu	Tyr	Gln	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	His	Gln	Phe	Ile	Asn	Pro
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Val	Met	Val	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Glu	Gly	Ala	Pro
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Leu Ala Gly Leu Ala Gln Tyr Tyr Thr Gln Tyr Ser Gly Thr Ile
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Glu Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Leu Phe Gln Ile Thr
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gln Gly Trp Val Cys Leu Phe Gln Ile Thr His Gly Lys Ala Asp
1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Tyr	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val
1			5					10					15	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Gly	Lys	Met	Glu
1				5				10					15	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Asn	Ile	Lys	His	Leu	Leu	His	Thr	Gly	Ile	Gly	Thr	Ala	Ser	Arg
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Ala	Ile	Asp	Asp	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Trp	Thr	Pro	Asp	Pro	Ser
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

Leu	Leu	Lys	Met	Lys	Ala	His	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	His	His	Glu
1				5					10					15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

Pro	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Val	Arg	Ser	Asn	Phe	Ser	Lys	Leu	Val
1				5				10					15	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

Ala Pro Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

Ala Gly Leu Val Lys Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg Ser Thr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

Val Ala Ser Ser Phe Phe Arg Ser Thr Pro Glu Asp Leu Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

Phe	Phe	Arg	Ser	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Glu	Lys
1				5					10				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

Ile	Ser	Ile	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Ile
1				5					10				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

Lys Arg Gln Lys Met Val Asp Asp Ala Val Asn Glu Tyr Ile
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

Asn Glu Tyr Ile Glu Lys Ala Asn Ile Thr Thr Asp Asp Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

Thr Asp Asp Lys Thr Leu Asp Glu Ala Glu Lys Ser Pro Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

Thr Val Gly Phe Arg Glu Arg Thr Leu Pro Gly Gln Lys Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

Asp Asp Val Asn Ser Glu Pro Ala Gln Pro Val Glu Glu Gln
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTES: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys
1 5 10

Patentansprüche

1. MKSV-Vakzine auf der Basis von Peptiden mit einer Sequenz von mindestens 8 Aminosäuren, die einer Teilsequenz aus dem Nichtstrukturproteinbereich des MKSV entspricht, die durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen Antikörpern oder durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen T-Lymphozyten selektiert wurde.
5
2. Peptide gemäß Anspruch 1, bestehend aus 8-35 Aminosäuren.
3. Peptide gemäß Anspruch 1, bestehend aus 8-15 Aminosäuren.
4. MKSV-Vakzine für Schweine, bei der die Peptide gemäß Anspruch 1
10 Teilen von Bereichen auf dem Genom des MKSV entsprechen, die für die Proteine L/L', 1A, 1B, 1C, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D kodieren.
5. MKSV-Vakzine für Rinder, bei der die Peptide gemäß Anspruch 1 Teilen von Bereichen auf dem Genom des NKSX entsprechen, die für die Proteine 1D, 2B, 2C, 3A, 3B kodieren.
6. Peptide gemäß Anspruch 1, die durch Kupplung an Carrierproteine oder
15 inaktivierte Viren modifiziert sind.
7. Peptide gemäß Anspruch 1, die durch eine Expression der DNA-Sequenzen in rekombinanten Systemen hergestellt werden.
8. DNA-Sequenzen, die für die Peptide gemäß Anspruch 1 kodieren und in
20 rekombinanten Systemen enthalten sind.
9. Verwendung von Peptiden gemäß Anspruch 1 in Detektionssystemen zum Nachweis MKSV infizierter Tiere, zur Unterscheidung vakzinierter und infizierter Tiere oder zur Immunisierung von Tieren.
10. Verwendung von Peptiden gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Detek-
25 tionssystemen zum Nachweis MKSV infizierter Tiere, zur Unterscheidung

vakzinierter und infizierter Tiere oder zur Herstellung von Vakzinen zur Immunisierung von Tieren gegen MKSV-Infektionen.

Immunogene Peptide von Maul- und Klauenseuchen-Viren

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft MKSV-Vakzine auf der Basis von Peptiden mit einer Sequenz von mindestens 8 Aminosäuren, die einer Teilsequenz aus dem Nichtstrukturproteinbereich des MKSV entspricht, die durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen Antikörpern, oder durch Immunreaktivität mit MKSV spezifischen T-Lymphozyten selektiert wurde sowie ihre Herstellung und ihre Verwendung.